KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 21, No. 1, pp 164~172(1989)

Streptococcus thermophilus 510의 β-galactosidase에 의한 galactooligosaccharides의 생성에 관한 연구

박신인·강국희
성균관대학교 낙농학과

Formation of galactooligosaccharides by β-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* 510

Shin-In Park and Kook-Hee Kang
Department of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University, Suwon

Abstract

The formation of galactooligosaccharides by transgalactosidation reactions during hydrolysis of lactose by the β-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* 510 was investigated. Three oligosaccharides were detected during hydrolysis. It was found that the optimum conditions for the production of oligosaccharides was 40% lactose treated with β-galactosidase(50 ONPG units/ml) at 37℃ for 4 hours. The oligosaccharides formed accounted for 30% of the total sugars when the lactose had been 94% hydrolysed. 69% of the oligosaccharides were identified as 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose(allolactose) and 23% as 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-galactose(isogalactobiose). The separation of galactooligosaccharides by the use of Bio-Gel P-2 gel permeation chromatography was also studied.

Key words: β-Galactosidase, transgalactosidation, galactooligosaccharide, allolactose, isogalactobiose.

서 론

β-Galactosidase는 동물, 식물과 미생물등 자연에 널리 분포되어 있다[1]. β-Galactosidase는 가수분해와 전이반응을 동시에 일으킬 수 있는 활력을 가지고 있는 효소이다[2,3]. 유당이 β-galactosidase에 의해 가수분해 될 때 생성된 galactose가 단당류, 다당류, 혹은 alcohol과 같은 활성 수용체 분자에 결합하여 새로운 glycosidic 결합이 형성되어 여러 종류의 oligosaccharides를 생성하게 되는 반응을 transgalactosidation이라 한다[4,5,6]. 이 효소에 의해 galactose 전이반응이 일어나는 정도와 생성된 galactooligosaccharide의 형태는 효소의 생산 기원, 기질 농도, pH, 온도와 기질의 특성에 따라서 크게 달라진다.

고온성 유산균인 *Streptococcus thermophilus*로 부터 생산된 β-galactosidase는 최적 활성 온도와 열 안정성이 높으므로 산업적인 이용에 더욱 적합한 것으로 나타났다[7,8,9]. Toba 등[10]은 최초로 *S. thermophilus* β galactosidase의 transgalactosidation 반응에 대해 보고 하였으며, 그 후 Greenberg와 Mahoney[11]가 우유의 유당으로부터 이 효소에 의해 형성되는 oligosaccharides의 종류와 생성양에 대해 조사하였으나 이들 구성당의 분리 정제는 이루어지지 않았다.

본 연구는 *Streptococcus thermophilus* 510의 β-galactosidase에 의해 유당이 가수분해되는 동안 transgalactosidation 반응으로 생성되는 galactooligosaccharides의 생성과 분리 정제에 관해 검토하였다.

Corresponding author: Kook-Hee Kang, Department of Dairy Science, College of Agriculture, Sung kyun kwan University, 300 Chunchun-Dong, Suwon, Kyungki-Do, 440-746

재료 및 방법

재료

Streptococcus thermophilus 510으로부터 생산되는 β-galactosidase는 전보에 보고된 방법에 따라서 정제하여 사용하였다[12]. 표준 당으로 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-galactose(isogalactobiose)와 6-o-β

-D-galactopyranosyl-D-glucose(allolactose)는 T. Toba 교수(Tohoku University, Sendai, Japan)로부터 기증 받았다.

Transgalactosidation 반응

Galactooligosaccharide 생성에 영향을 미치는 유당 농도(5-50%), 효소 농도(25-250 ONPG units/ml), 반응 온도(30℃, 37℃, 45℃, 50℃)와 반응 시간(1~12시간)의 영향을 검토하기 위해서 각 반응 조건에 대하여 유당 용액에 정제된 본 효소를 반응시켜 galactose 전이반응이 일어나도록 하였다. 여기서 효소 1 ONPG unit란 37℃에서 1분당 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0)하에서 5mM o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG)로부터 1 μmole의 o-nitrophenol(ONP)을 유리시키는데 필요한 효소량을 말한다. Galactooligosaccharide가 생성된 후 반응액을 100℃에서 5분 동안 가열하여 효소를 불활성화시켜 반응을 정지시켰다.

당류의 정량 및 분석

생성된 galactooligosaccharides의 정량 분석은 high performance liquid chromatography(Bio LC, Dionex Co.)를 사용하여 다음과 같은 조건으로 행하였다.

Column: carbohydrate column(HPIC-AS 6A, 5 μ),

Detector: Pulsed Amperometric Detector (PAD),

Eluant: 15mM NaOH, Flow rate: 0.8ml/min., Injection volumn: 5μl.

표준 당으로서 lactose, galactose, glucose, 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose(allolactose), 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-galactose(isogalactobiose)를 1.0% 표준당 용액으로 조제하였다.

Thin-layer chromatography(TLC) 분석

유당 용액에서 본 효소의 transgalactosidation 반응에 의해 생성된 galactooligosaccharides의 종류를 반응액 중에 있는 lactose, glucose, galactose와 분리하여 확인하기 위하여 Suyama 등[13]이 기술한 TLC 방법을 이용하였다.

TLC plate로는 silica gel 60 TLC(Merck, 20×20 cm aluminium sheet, Art. 5553)를 사용하였으며, TLC 전개조에서 ethylacetate : acetic acid : water (2 : 1 : 1, v/v)을 전개 용매로 하여 복합 상승법(2회)으로 전개 시켰다. 전개 후 TLC plate는 100℃에서 10분간 건조시키고 0.5% benzidine 발색제[14]를 분무하고 100℃에서 15분간 발색시켰다.

Galactooligosaccharide의 정제

Galactooligosaccharides의 분리 정제는 Bio-Gel P-2 gel permeation chromatography 방법에 의하였다[15]. 40% 유당 용액에 정제 효소(50 ONPG units/ml)를 첨가하여 37℃에서 4시간 반응 후 반응액을 100℃에서 5분간 가열하여 반응을 정지하였다. 이와 같이 하여 조제한 반응액을 Bio-Gel P-2(200-400 mesh, Bio-Rad Lab.) column(2×180cm)에 주입한 후 1시간당 15ml 속도로 deionized, degassed water로 용출하여 2ml씩 분획 채취하였고, column과 용출액을 chromatography 과정동안 계속 일정하게 60℃로 유지시켰다. Orcinol-sulfuric acid reagent을 사용하여 각 분획들의 당 농도별 흡광도를 425nm에서 측정하였다[16].

분획 수집된 galactooligosaccharide의 종류와 순도는 HPLC 분석과 TLC 방법에 따라 분석 확인하였다.

결과 및 고찰

β-Galactosidase의 transgalactosidation 반응

유당 용액에서 정제된 *Streptococcus thermophilus* 510의 β-galactosidase는 가수분해 반응에 의해 glucose와 galactose를 생성함과 동시에 transgalactosidation 반응을 일으켜 galactooligosaccharides을 형성하였으며, 이것은 high performance liquid chromatography(HPLC) 분석에 의해서 확인되었다(Fig. 2). Fig. 1은 표준당의 혼합 용액을 본 실험조건 하에서 15mM NaOH로 용출시켰을 때 얻어진 HPLC chromatogram으로서 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-galactose(isogalactobiose)와 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose(allolactose)는 각각 17.47분과 21.15분의 retention time을 보였다. 40% 유당 용액에 β-galactosidase를 4시간(pH 7.0, 37℃) 반응시켰을 때 반응액 중에는 17.47분, 21.18분과 24.43분의 retention time에서 peak을 나타내는 (peak 5, 6, 8) 세개의 oligosaccharides가 생성 되었음을 Fig. 2에서 알 수 있었다. 그리고 retention time이 짧은 것으로부터 각각 oligosaccharide I, oligosaccharide II,

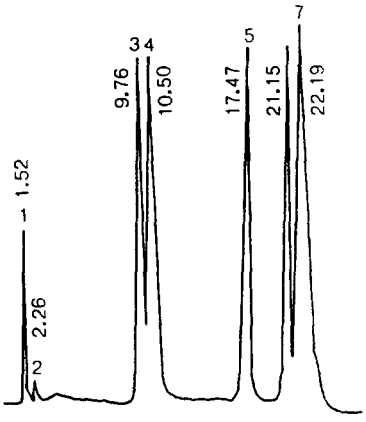

Fig. 1. High performance liquid chromatography chromatogram of various carbohydrates 1, solvent, retention time, 1.52 min.; 2, unknown, 2.26 min.; 3, galactose, 9.76 min.; 4, glucose, 10.50 min.; 5, 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-galactose, 17.47 min.; 6, 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose, 21.15 min.; 7, lactose, 22.19 min.

oligosaccharide III으로 명명하였다.

이러한 사실은 표준당 용액과 함께 유당 용액에 효소 처리된 반응액을 silica gel 60 TLC plate에서 상승 전개시킨 TLC chromatogram(Fig. 3)에 나타난 결과와 일치하였으며, 유당 용액에 효소 처리된 반응액에서 lactose, glucose, galactose 이외에 lactose 보다 이동거리가 짧은 곳에 세개의 oligosaccharides가 형성되었다. TLC chromatogram에서 각 당의 분리도를 Rf 및 Rglu 값으로 나타낸 결과는 Table 1과 같았다. 표준당의 Rf 값과 비교한 결과 oligosaccharide I과 II는 각각 allolactose와 isogalactobiose로 추정되었으며, oligosaccharide III의 구조는 확인되지 못하였다.

Streptococcus thermophilus 510의 β-galactosidase에 의해서 생성된 세 종류의 oligosaccharides 중에서 β(1→6) 결합을 가진 이당류가 주요 당들로서, 이것은 Greenberg와 Mahoney[11]의 보고와 일치하였다. 이러한 특성은 *Lactobacillus plantarum*[10], *Aspergillus niger*[17]와 *Kluyveromyces fragilis*[17]의 β-galactosidase에 의한 transgalactosidation 작용과 유사한 것으로 나타났지만, 삼당류 이상의 oligosaccharide 생성량이 많은 *Kluyveromyces lactis*[18]와 *Aspergillus oryzae*[19] β-galactosidase의 transgalactosidation 작용과는 상이하게 나타났다.

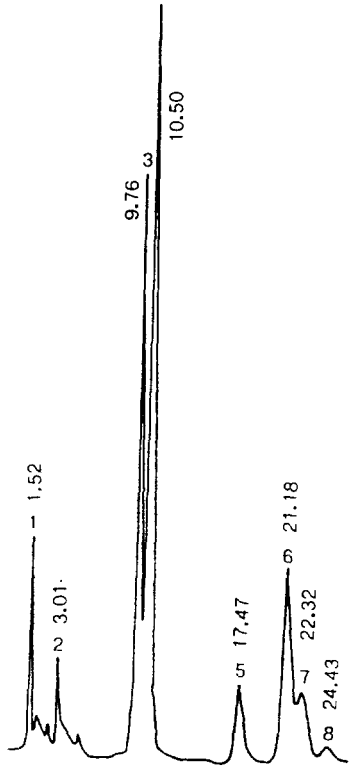

Fig. 2 HPLC chromatogram of transgalactosidation reaction products of lactose with β-galactosidase 1, solvent; 2, unknown; 3, galactose; 4, glucose; 5, 6-o-β-D-galactopyranosyl D-galactose; 6, 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose; 7, lactose; 8, oligosaccharide III

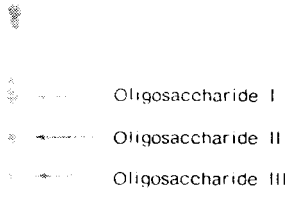

Fig. 3 The separation of lactose hydrolyzate by silica gel 60 thin-layer chromatography 1, lactose; 2, glucose; 3, galactose; 4, allolactose; 5, isogalactobiose; 6, lactose hydrolyzate.

Table 1. Rf and R_{glu} values of various carbohydrates separated on thin-layer chromatogram

Carbohydrate	R_f value[a]	R_{glu} value
Glucose	0.88	1.00
Galactose	0.85	0.95
Lactose	0.70	0.69
Oligosaccharide I	0.65	0.64
Oligosaccharide II	0.50	0.45
Oligosaccharide III	0.33	0.28

a) The Rf value for multiple ascending was calculated as follows: $^2Rf = 1-(1-Rf)^2$.

Galactooligosaccharide의 생성 조건

Streptococcus thermophilus 510의 β-galactosidase에 의한 galactose 전이반응에 의해서 형성되는 oligosaccharides이 최대 생성 조건을 결정하기 위하여 기질 농도, 효소 농도, 반응 온도 및 반응 시간에 따른 oligosaccharide의 생성량과 단당류의 생성량을 HPLC로 정량 분석하였다.

유당 농도, 효소 농도와 반응 온도가 oligosaccharide의 생성율과 단당류의 생성율에 미치는 영향을 분석한 결과는 각각 Table 2, Table 3, Table 4와 같았다. 유당 농도에 따른 oligosaccharide의 생성율을 비교한 Table 2에 의하면, 유당 농도가 증가함에 따라서 oligosaccharide의 생성량도 증가하여, 40% 유당 농도에서 유당이 93% 가수분해 되었을 때 총 당량의 30.20%의 oligosaccharide을 생성함으로써 최고치에 달하였다(Fig. 4). 이와 같이 기질 농도가 증가함에 따라 oligosaccharide 생성율이 증가하는 것은 Burvall 등[20]에 의해서도 보고되었다.

Table 2. Analysis of sugars in lactose hydrolyzate at different concentration of lactose[a]

Lactose conc. (%)	Sugar content (%)					
	Lactose	Glucose	Galactose	Oligosaccharides[b] I	II	III
5	0.00	52.80	45.40	1.80	0.00	0.00
10	0.00	51.74	42.35	5.91	0.00	0.00
15	0.00	50.41	40.59	9.00	0.00	0.00
20	0.00	49.71	38.85	11.44	0.00	0.00
25	2.94	48.35	35.73	11.64	1.34	0.00
30	3.80	47.90	30.10	12.73	3.39	2.08
40	6.93	37.00	25.87	20.09	7.84	2.27
50	8.89	36.60	25.20	19.57	7.14	2.60

a) Catalyst: β-galactosidase from *S. thermophilus* 510, 50 ONPG units/ml. Temperature: 37°C. Time: 4 hours.
b) I: 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose
II: 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-galactose
III: trisaccharide

Table 3. Analysis of sugars in lactose hydrolyzate at different levels of enzyme activity[a]

Enzyme activity (ONPG unit/ml)	Sugar content (%)					
	Lactose	Glucose	Galactose	Oligosaccharides[b] I	II	III
25	16.65	34.54	21.62	19.16	5.66	2.37
50	6.21	38.06	24.84	20.26	8.59	2.04
100	0.00	41.30	40.30	11.49	6.91	0.00
150	0.00	48.12	40.04	6.50	5.34	0.00
200	0.00	45.97	44.68	5.12	4.23	0.00
250	0.00	45.23	49.24	2.51	3.02	0.00

a) Catalyst: β-galactosidase from *S. thermophilus* 510. Initial lactose concentration: 40%. Temperature: 37°C. Time: 4 hours
b) I: 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose
II: 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-galactose
III: trisaccharide

Table 4. Analysis of sugars in lactose hydrolyzate at different incubation temperature[a]

Incubation temp (°C)	Sugar content (%)					
	Lactose	Glucose	Galactose	Oligosaccharides[b] I	II	III
30	8.11	39.80	25.53	18.42	5.35	2.79
37	6.35	38.14	24.90	20.48	8.15	1.98
45	8.69	41.67	24.35	18.24	5.74	1.31
50	8.14	39.83	30.20	17.43	3.32	1.08

a) Catalyst: β-galactosidase from *S. thermophilus* 510, 50 ONPG units/ml. Initial lactose concentration: 40%. Time: 4 hours.
b) I: 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose
II: 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-galactose
III: trisaccharide

40% 유당 용액에서 (pH 7.0, 37°C, 4시간) 최대의 당 전이반응을 일으킬 수 있는 효소의 농도를 결정하기 위한 실험 결과가 Table 3에 나타나 있다. 효소 농도가 50 ONPG units/ml 이었을 때 oligosaccharide의 가장 높은 생성량(30.89%)을 보였다. 그러나 효소 농도가 100 ONPG units/ml 이상으로 증가하면서 단당류의 양이 총 당의 81.60% 이상으로 증가하는 반면 oligosaccharide의 생성량은 18.40% 이하로 감소되었는데 이것은 높은 효소 농도에 의해서 형성된 oligosaccharides가 다시 가수분해 되었기 때문이라고 생각되었다. Wallenfels와 Weil[5]은 D-galactose와 (1→4)와 (1→6) β-D-galactoside 결합을 갖고 있는 oligosaccharide가 β-galactosidase에 의해서 가수분해 된다고 보고하였으며, 본 효소가 allolactose와 isogalactobiose를 가수분해 시키는 것이 본 실험에서 HPLC분

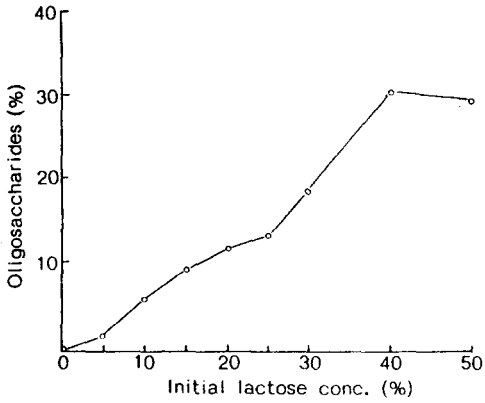

Fig. 4. Effect of initial lactose concentration on the formation of total oligosaccharides.

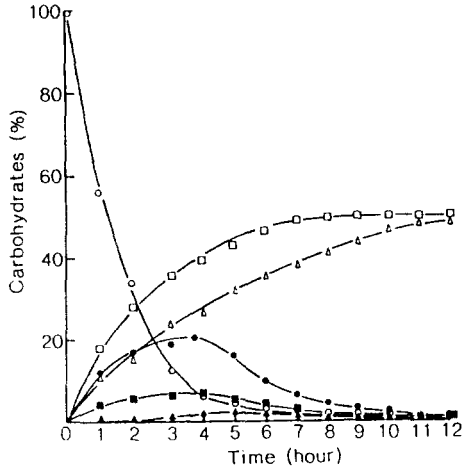

Fig. 5. Profile of rates of utilization of lactose and the formation of products with time for 40% lactose Lactose, ○; glucose, □; galactose, △; 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose, ●; 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-galactose, ■; oligosaccharide III, ▲.

석 결과 확인되었다.

Oligosaccharide의 최대 생성을 위한 최적의 유당 농도(40%)와 효소 농도(50 ONPG units/m*l*) 조건의 반응액을 30℃, 37℃, 45℃와 50℃에서 반응시킨 결과는 Table 4에서 보는 바와 같았다. 37℃에서 반응시켰을 때 가장 많은 oligosaccharide(30.61%)가 생성되었으며, 45℃ 이상의 온도에서는 생성량이 약간 감소되었다. 이것은 본 효소의 열 안정성에 대한 특성을 따라 나타난 결과로 생각된다.

반응 시간에 따른 반응 생성물의 농도 변화를 나타낸 결과(Fig. 5)를 보면 유당이 단당류로 분해되면서 곧 oligosaccharides가 형성되기 시작하였으며, glucose 양이 galactose 양보다 많은 것은 galactose가 oligosaccharide 합성에 더 많이 이용 되었음을 나타낸 결과로 판단되었다.

반응 후 4시간에 oligosaccharide의 생성양이 최고치에 달하여 총 당량의 30.25% 이었으며, 이 때 allolactose는 생성된 총 oligosaccharides의 69%, isogalactobiose는 23%를 차지하였다. 그러나 이후 시간부터는 oligosaccharide의 농도는 감소하였는데 이것은 본 효소에 의해서 oligosaccharide가 합성되는 속도보다 가수분해 되는 속도가 더 빠르기 때문인 것으로 추정되었다. Greenberg와 Mahoney[11]는 *Streptococcus thermophilus*의 β-galactosidase가 우유의 유당으로부터 생성한 oligosaccharides(총 당량의 25%)은 allolactose와 isogalactobiose이며, 각각 총 oligosaccharides의 60%와 30%에 해당된다고 보고하였다.

반응시간 동안 각 당의 농도 변화를 요약한 결과가 Table 5에 나타난 바와 같이 glucose와 galactose의 비율이 반응 2시간에서 1.89로 최대치였으며 이 때 35%의 유당이 분해되지 않았고 oligosaccharide의 생성양도 최고치에 달하지 못하였다. Glucose와 galactose의 농도 차이가 가장 크게 나타난 것은 거의 모든(93.86%) 유당이 가수분해 되어 최대의 oligosaccharides(30.25%)가 형성된 반응 4시간 후였으며 이 경우 glucose와 galactose의 비율은 약간 감소되었다. Oligosaccharides에 포함된 glucose와 galactose의 비율은 반응이 진행되어감에 따라 계속 감소하였다. 이러한 결과는 glucose를 함유하고 있는 oligosaccharide(allolactose)가 galactose 만으로 구성된 oligosaccharide (isogalactobiose) 보다 빠른 속도로 가수분해 되기 때문이라고 생각된다.

지금까지 보고된 바에 의하면 *Escherichia coli*의 β-galactosidase가 17% 유당 용액에서 54%의 가장 높은 oligosaccharides 생성율을 보였고[6], *Kluyveromyces fragilis*[17]와 *Aspergillus oryzae*[21]의 β-galactosidase는 30% 유당 용액에서 총 30%의 oligosaccharides을 생성하였다. 본 실험에서 정제된 *Streptococcus thermophilus* 510의 β-galactosidase는 40% 유당 용액에서 총 30%의 oligosaccharides 생성을 보임으로써, 본 실험에 사용된 oligosaccharide의 최대 생성 조건은 유당 40%, 효소 50 ONPG units/m*l*의 조성으로 된 혼합액을 37℃에서 4시간 동안 반응시키기로 하였다.

Table 5. Distribution of sugars during hydrolysis of lactose by β-galactosidase from *S. thermophilus* 510

Time (hr.)	Lactose (%)	Glucose (%)	Galactose (%)	Glucose/ galactose ratio	Oligosaccharides (%)	Glucose/galactose ratio in oligo-saccharides[a]
1	55.30	18.09	10.18	1.777	16.43	0.350
2	34.45	28.06	14.84	1.891	22.65	0.263
3	14.05	37.49	21.74	1.724	26.72	0.258
4	6.14	40.92	22.69	1.576	30.25	0.248
5	4.37	43.68	29.18	1.300	22.77	0.222
6	3.52	45.34	34.97	1.297	16.17	0.218
7	3.01	47.89	38.63	1.299	10.47	0.061
8	2.10	48.81	41.48	1.230	7.61	0.019
9	1.54	49.11	43.02	1.160	6.33	0.019
10	1.21	49.36	46.49	1.072	2.94	0.012

a) The amount of each monosaccharide was calculated as the total monosaccharide resulting from lactose hydrolysis minus the free monosaccharide.

Galactooligosaccharide의 정제

상기 조건에서 형성된 galactooligosaccharides를 반응액 중에 있는 단당류인 glucose와 galactose로 부터 분리 정제하기 위하여 Bio-Gel P-2 gel permeation chromatography 방법을 사용하였다.

표준당 혼합 용액(lactose, glucose, galactose, allolactose, isogalactobiose)을 Bio-Gel P-2 gel permeation chromatography 하여 용출된 각 분획을 orcinol-sulfuric reagent로 발색 시킨후 425*nm*에서 흡광도를 측정한 결과, Fig. 6에 나타난 바와 같이 5개의 peak는 용출된 순서대로 각각 lactose, isogalactobiose, allolactose, glucose, galactose로 밝혀졌다.

유당 반응액을 Bio-Gel P-2 column에 흡착시킨 후 용출시켰을 때에는 Fig. 7과 같은 6개의 peak가 검출되었다. 각각의 peak을 Fig. 6의 표준당 용액의 분획 위치와 비교하였을 때, peak 2, 3, 4, 5와 6은 각각 차례대로 lactose, isogalactobiose, allolactose, glucose와 galactose의 peak와 일치하였다. 그러나 peak 1은 유당보다 먼저 용출된 점으로 미루어 유당보다 분자량이 큰 당으로 HPLC chromatogram(Fig. 2)과 TLC chromatogram(Fig. 3)에서 보여 주었던 oligosaccharide III으로 trisaccharide인 것으로 생각되나, 이 당의 생성율이 매우 낮기 때문에 구조 결정은 하지 못하였다.

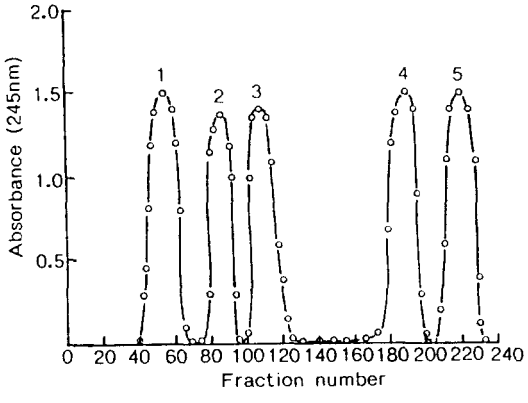

Fig. 6. Adsorption chromatogram of mono- and disaccharides on Bio-Gel P-2 gel permeation chromatography 1, lactose; 2, 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-galactose; 3, 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose; 4, glucose; 5, galactose.

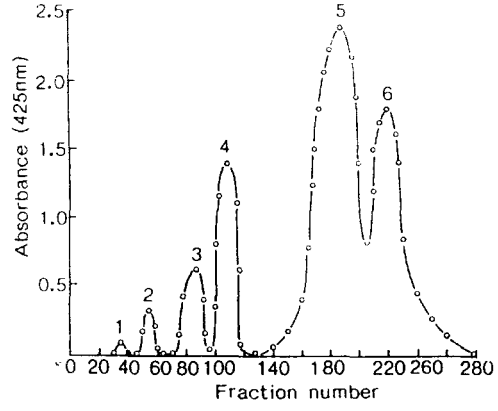

Fig. 7. Chromatographic separation of lactose hydrolyzate on Bio-Gel P-2 gel permeation chromatography 1, trisaccharide; 2, lactose; 3, 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-galactose; 4, 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose; 5, glucose; 6, galactose.

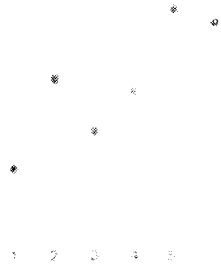

Fig. 8. Thin-layer chromatogram of various carbohydrates on silica gel 60 TLC plate 1, trisaccharide; 2, lactose; 3, isogalactobiose; 4, allolactose; 5, glucose; 6, galactose.

본 실험에서 보는 바와 같이 polyacrylamide gel인 Bio-Gel P-2(200-400 mesh)을 사용하여 유당 반응액 중에 혼합되어 있는 당들을 각각의 구성당으로 분리 정제하는 것은 매우 효과적인 것으로 나타났으며, 이러한 사실은 Hjerten와 Mosbach[22]에 의해서도 보고되었다. Gel permeation chromatography를 실시하는 과정에서 column과 용출액의 온도를 일정하게 60℃로 유지시켰을 때 분리 효과가 좋았으며, 증류수를 용출액으로 사용하므로써 분획된 당들을 감압 농축하여 쉽게 순수한 당으로 정제할 수 있었다.

John 등[23]도 oligosaccharide가 용출되는 상태는 온도와 밀접한 관계가 있으며 효과적인 분리를 위해서는 column의 온도를 항온으로 일정하게 유지시켜야 한다고 보고한 바 있다. 따라서 Bio-Gel P-2 gel permeation chromatography 방법에 의해 oligosaccharides을 분리 정제하는 것은 다른 방법들에 비해서 매우 편리하고 효과적인 것으로 나타났다.

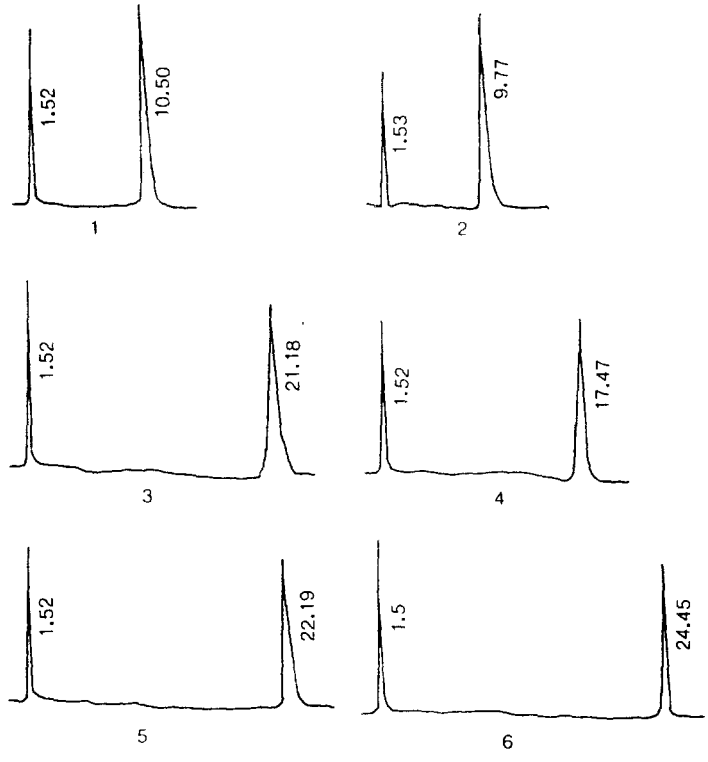

Fig. 9. HPLC chromatograms of various carbohydrates isolated from lactose hydrolyzate 1, glucose; 2, galactose; 3, allolactose; 4, isogalactobiose; 5, lactose; 6, trisaccharide

분획 수집된 6개 당의 순도와 종류를 확인하기 위해서 각각의 당을 TLC와 HPLC 방법에 의해 분석한 결과는 Fig. 8의 TLC chromatogram과 Fig. 9의 HPLC chromatogram에 나타난 바와 같았다. TLC chromatogram에 나타난 각 당의 spot의 Rf 값을 Fig. 3의 TLC chromatogram의 표준당의 Rf 값과 비교하여 각 당의 종류를 확인하였으며, 또한 각각의 당들이 단일 spot만을 나타냄으로써 각 당의 순도를 확인할 수 있었다. HPLC chromatogram에 나타난 peak를 표준당의 retention time(Fig. 1)과 대조하였을 때 Bio-Gel P-2 gel permeation chromatography에 의한 6개 당의 분리성이 높음을 알 수 있었다. 따라서 유당 용액 40%에 *Streptococcus thermophilus* 510의 β-galactosidase를 반응시켜 transgalactosidation에 의해 형성된 galactooligosaccharides를 Bio-Gel P-2 gel permeation chromatography 방법에 의해서 순수하게 분리 정제하였다.

본 효소에 의한 galactose 전이반응의 주 생성물은 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose(allolactose)로써, 유당이 약 94% 가수분해 되었을 때 총 당의 20%가 allolactose로써 이것은 영양학적인 면에서 중요한 가치를 가지고 있다. Burvall 등[24]은 *Kluyveromyces lactis*의 β-galactosidase에 의해서 생성된 β-(1→6) 결합을 가지고 있는 oligosaccharides가 인체내의 소장 β-galactosidase에 의해서 가수분해 되는 정도는 유당의 10%에 지나지 않으며, 분해가 잘 되지 않았다고 보고하였다. 또한 이러한 oligosaccharides는 비흡수 당으로서 소장에서 흡수되지 않고 통과하여 대장에 이르러 장내 세균의 탄소원으로 이용된다고 하였다[25]. 그러므로 이와 같은 galactooligosaccharides가 모유영양아의 장내 세균으로서 우세균인 *Bifidobacterium*의 bifidus factor로써 작용할 수 있는 선택적인 탄소원이 될 수 있는지에 대한 연구가 필요하다고 본다.

요 약

Streptococcus thermophilus 510의 β-galactosidase는 유당을 가수분해 하는 동시에 galactose 전이반응을 일으켜 세 종류의 galactooligosaccharides를 형성하였다.

Oligosaccharide의 최대 생성 조건은 40% 유당 용액에 효소 50 ONPG units/m*l*를 첨가한 혼합액을 37℃에서 4시간 반응시켰을 때 이며, 이 조건에서 유당이 약 94% 가수분해 되었고 생성된 oligosaccharides의 양은 총 당의 약 30% 이었다.

생성된 총 oligosaccharides의 69%는 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose(allolactose), 23%는 6-o-β-D-galactopyranosyl-D-galactose(isogalactobiose) 이었으며, 형성된 galactooligosaccharides을 Bio-Gel P-2 gel permeation chromatography 방법에 의해서 순수하게 분리 정제하여 구조를 조사하여 본 결과 glucose, galactose, allolactose, 그리고 isogalactobiose 임을 확인할 수 있었다.

문 헌

1. Shukla, T.D. : Beta-galactosidase technology: A solution to the lactose problem. *CRC Crit. Rev. Food Technol.*, **5**, 325(1975)
2. Kulp, K. : Carbohydrases. *In Enzymes in Food Processing*, Reed, G.(ed.), 2nd ed., Academic Press, New York, p.92(1975)
3. Wallenfels, K. and Malhotra, O.P. : Galactosidases. *In Adv. Carbohydrate Chem.*, Wolfrom, M.L.(ed.), Academic Press, New York, Vol. 16, p.239(1961)
4. Aronson, M. : Transgalactosidation during lactose hydrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **39**, 370(1952)
5. Wallenfels, K. and Weil, R. : β-Galactosidase. *In The Enzymes*, Boyer, P.D.(ed.), 3rd ed., Academic Press, New York, Vol. 7, p.617(1972)
6. Huber, R.E., Kurz, G. and Wallenfels, K. : A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of β-galactosidase(*E. coli*) on lactose. *Biochemistry*, **15**, 1994(1976)
7. Somkuti, G.A. and Steinberg, D.H. : β-D-Galactoside galactohydrolase of *Streptococcus thermophilus*: Induction, purification, and properties. *J. Appl. Biochem.*, 1, 357(1979)
8. Ramana Rao, M.V. and Dutta, S.M. : Purification and properties of beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.*, **46**, 1419(1981)
9. Greenberg, N.A. and Mahoney, R.R. : Production and characterization of β-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *J. Food Sci.*, **47**, 1824(1982)

10. Toba, T., Tomita, Y., Itoh, T. and Adachi, S. : β-Galactosidases of lactic acid bacteria: Characterization by oligosaccharides formed during hydrolysis of lactose. *J. Dairy Sci.*, **64**, 185(1981)
11. Greenberg, N.A. and Mahoney, R.R. : Formation of oligosaccharides by β-galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Food Chem.*, **10**, 195(1983)
12. 강국희 · 박신인: *Streptococcus thermophilus* 510에 의한 β-galactosidase의 생산, 정제 및 특성. 한국산업미생물학회지, 17, (1989)
13. Suyama, K., Adachi, S., Toba, T., Sohma, T., Hwang, C.J. and Itoh, T. : Isoraffinose(6^G-β-galactosylsucrose) synthesized by the intermolecular transgalactosylation reaction of *Escherichia coli* β-galactosidase. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2069(1986)
14. Wierzbicki, L.E. and Kosikowski, F.V. : Formation of oligosaccharides during β-galactosidase action on lactose. *J. Dairy Sci.*, **56**, 1400(1973)
15. Kennedy, J.F. and Fox, J.E. : Fully automatic gel permeation chromatographic analysis of neutral oligosaccharides. *In Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler, R.L. and BeMiller, J.N.(ed.), Academic Press, New York, Vol. 8, p.13(1980)
16. Kennedy, J.F. and Fox, J.E. : Fully automatic ion exchange chromatographic analysis of neutral monosaccharides and oligosaccharides. *In Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler, R.L. and BeMiller, J.N.(ed.), Academic Press, New York, Vol. 8, p. 3(1980)
17. Toba, T. and Adachi, S. : Hydrolysis of lactose by microbial β-galactosidase. Formation of oligosaccharides with special reference to 2-o-β-D-galactopyranosyl-D-glucose. *J. Dairy Sci.*, **61**, 33(1978)
18. Asp, N.G., Burvall, A., Dahlqvist, A., Hallgren, P. and Lundblad, A. : Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase(Maxilact^R): Part 2-oligosaccharide structures. *Food Chem.*, **5**, 147(1980)
19. Toba, T., Yokota, A. and Adachi, S. : Oligosaccharide structures formed during the hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β-galactosidase. *Food Chem.*, **16**, 147(1985)
20. Burvall, A., Asp, N.G. and Dahlqvist, A. : Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase(Maxilact^R): Part 1-Quantitative aspects. *Food Chem.*, **4**, 243(1979)
21. Betschart, H.F. and Prenosil, J.E. : High performance liquid chromatographic analysis of the products of enzymatic lactose hydrolysis. *J. chromatography.*, **299**, 498(1984)
22. Hjerten, S. and Mosbach, R. : Molecular-sieve chromatography of proteins on columns of cross-linked polyacrylamide. *Anal. Biochem.*, **3**, 109(1962)
23. John, M., Trenel, G. and Dellweg, H. : Quantitative chromatography of homologous glucose oligomers and other saccharides using polyacrylamide gel. *J. chromatog.*, **42**, 476(1969)
24. Burvall, A., Asp, N.G. and Dahlqvist, A. : Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *Saccharomyces lactis* lactase(Maxilact^R): Part 3-Digestibility by human intestinal enzymes *in vitro*. *Food Chem.*, **5**, 189(1980)
25. Toba, T. : β-Galactosidase: Its application to lactose hydrolysis and galactooligosaccharide production. *JAP. J. Dairy Food Sci.*, **34**, A-169(1985)

(1988년 11월 22일 접수)